中国生态农业学报 2017 年 3 月 第 25 卷 第 3 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Mar. 2017, 25(3): 400−409

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.160583

马云艳, 徐万里, 唐光木, 顾美英, 薛泉宏. 生防链霉菌配施棉秆炭对连作棉田土壤微生物区系的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(3): 400−409
Ma Y Y, Xu W L, Tang G M, Gu M Y, Xue Q H. Effect of cotton stalk biochar application on soil microflora of continuous cotton cropping under use of antagonistic actinomycetes[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25(3): 400−409

生防链霉菌配施棉秆炭对连作棉田土壤微生物区系的影响*

马云艳[1], 徐万里[2], 唐光木[2], 顾美英[3**], 薛泉宏[4**]

(1. 西北农林科技大学生命科学学院 杨凌 712100; 2. 新疆农业科学院土壤肥料与农业节水研究所 乌鲁木齐 830091; 3. 新疆农业科学院微生物应用研究所 乌鲁木齐 830091; 4. 西北农林科技大学资源环境学院 杨凌 712100)

摘 要: 棉花是重要的经济作物, 长期连作能引起棉花土壤微生态的失衡、土传病害加重、进而导致产量和品质的下降, 影响棉花产业的健康发展。本文以连作棉田土壤为研究对象, 进行室内培养试验, 在施用生防放线菌黄三素链霉菌(*Streptomyces flavotricini*)的基础上添加不同量的棉秆炭[0 g·kg^{-1}(CK)、25.0 g·kg^{-1}、50.0 g·kg^{-1}、100.0 g·kg^{-1}], 采用微生物计数和 16S rDNA 基因序列分析的方法, 研究两者配施对连作棉田土壤中生防菌数量、微生物数量和种类的影响, 为棉花黄萎病的生物防治提供新的思路。研究结果表明: (1)生防放线菌配施棉秆炭对连作棉田土壤中微生物区系有显著的影响。与单施生防放线菌菌剂的处理相比, 两者配施显著增加了土壤中细菌、放线菌和真菌数量, 其中配施 25.0 g·kg^{-1} 棉秆炭处理使土壤中细菌/真菌数量比(B/F)、放线菌/真菌数量比(A/F)分别增加了 5 271.2%和 30.8%($P<0.05$)。(2)土壤中生防放线菌数量随着棉秆炭施用量增加而显著增加, 配施 100.0 g·kg^{-1} 棉秆炭处理显著增加了 2 672.8%($P<0.05$)。棉秆炭具有作为生防放线菌良好载体的潜力。(3)生防放线菌配施棉秆炭也改变了土壤中优势微生物的数量和比例, 尤其提高了细菌中芽孢杆菌的数量和所占的比例; 100.0 g·kg^{-1} 棉秆炭与菌剂配施使土壤中链霉菌的数量及比例显著高于对照, 但降低了小单孢菌数量; 增加了真菌中米曲梅、黑曲霉和木霉的数量, 但使其所占比例降低。由此可以看出, 生防放线菌配施棉秆炭能提高连作棉田土壤中生防放线菌的数量, 增强生防菌制剂的防病促生作用, 改善连作棉田土壤微生物群落结构, 在防控棉花连作障碍上具有较大的应用潜力。

关键词: 棉秆炭; 生防放线菌; 连作棉田; 土壤微生物区系
中图分类号: S154; S144 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2017)03-0400-10

Effect of cotton stalk biochar application on soil microflora of continuous cotton cropping under use of antagonistic actinomycetes*

MA Yunyan[1], XU Wanli[2], TANG Guangmu[2], GU Meiying[3**], XUE Quanhong[4**]

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Institute of Soil, Fertilizer & Agricultural

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201503136)、国家自然科学基金项目(31460148, 41261065, 41261059)、新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目(201431108)和新疆维吾尔自治区优秀青年科技人才培养项目(qn2015yx024)资助
** 通讯作者: 薛泉宏, 主要从事微生物资源利用研究, E-mail: xuequanhong123@163.com; 顾美英, 主要从事土壤微生物生态方面的研究, E-mail: gmyxj2008@163.com
马云艳, 主要从事微生物资源利用研究。E-mail: mayunyan0311@163.com
收稿日期: 2016-06-30 接受日期: 2016-08-19

* Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest in China (201503136), the National Natural Science Foundation of China (31460148, 41261065, 41261059), Xinjiang Key Technology Support Program (201431108) and the Training Project for Outstanding Young Scholars of Xinjiang (qn2015yx024)
** Corresponding author, XUE Quanhong, E-mail: xuequanhong123@163.com; GU Meiying, E-mail: gmyxj2008@163.com
Received Jun. 30, 2016; accepted Aug. 19, 2016

Water Saving, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 3. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 4. College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: As an important cash crop, cotton usually continuously cropped for a long-term, which causes an imbalance of soil microbial ecology, incidence of soil-borne disease increase, yield and quality decline, preventing the healthy development of cotton industry. Biochar application can increase soil microbe activity due to its higher porosity, huge specific surface area and ability of nutrient absorption. Biocontrol agents have been found to be effective in adjusting soil environment, alleviating continuous cropping obstacles and controlling soil-borne diseases. However, it is not clear how the biochar affects soil microbe of continuously cropped cotton field under the application of the biocontrol agent of antagonistic actinomycetes. In this paper, a lab incubation experiment was conducted to study the effects of cotton stalk biochar application on soil microflora of continuous cotton cropping under use of antagonistic actinomycetes. Based on antagonistic actinomycetes application, the experiment was designed in 4 treatments of biochar rate — 0 g·kg^{-1} (control), 25.0 g·kg^{-1}, 50.0 g·kg^{-1} and 100.0 g·kg^{-1}. The soil microflora was investigated after 15 days of incubation. The results showed that: 1) cotton stalk biochar influenced soil microflora under the application of antagonistic actinomycetes. Compared with control, cotton stalk biochar significantly increased the number of bacteria, actinomycetes and fungi in the soil. Applications with 25.0 g·kg^{-1} biochar increased bacteria/fungi (B/F) and actinomycetes/fungi (A/F) by 5 271.2% and 30.8% (P < 0.05), respectively. 2) The number of antagonistic actinomycetes significantly increased with increasing application of cotton stalk biochar. Applications with 100.0 g·kg^{-1} biochar into the soil significantly increased antagonistic actinomycete population by 2 672.8% (P < 0.05). Cotton stalk carbon served as a potential carrier of biocontrol actinomycetes. 3) Antagonistic actinomycetes with cotton stalk biochar changed the number and proportion of dominant microorganisms in the soil, and especially improved the number and proportion of *Bacillus*. The number and proportion of *Streptomyces* under the treatment with 100.0 g·kg^{-1} biochar into the soil were significantly higher than those of control treatment, while the number and proportion of *Micromonospora* were lower. The number of *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma koningii* increased while the proportions decreased. Therefore, the application of antagonistic actinomycetes and cotton stalk biochar increased the number of biocontrol agent and enhanced disease-controlling and growth-promoting abilities of antagonistic actinomycete, and also improved the structure of soil microbial community. It was concluded that the application of antagonistic actinomycetes and cotton stalk biochar had the potential to alleviate the adverse effects of continuous cropping cotton.
Keywords: Cotton stalk biochar; Antagonistic actinomycete; Continuous cropping cotton; Soil microflora

我国商品棉产区连作种植现象普遍存在。在集约化种植条件下，棉花(*Anemone vitifolia* Buch.)长期连作引起的连作障碍和枯、黄萎病等土传病害有蔓延趋势，已成为棉花种植业亟待解决的重大问题。连作障碍的本质是土壤根际微生态系统失调或恶化[1]。目前化学农药大量使用引起的药物残留、污染环境、易使病原菌产生抗药性积累等问题已不符合农业健康可持续发展的要求。生物防治及生态调控因其环境友好、无药物残留，有望从根本上防控土传病害，但防治效果与生防菌在土壤中的数量和定殖能力有关[2-4]。

目前，生防放线菌对作物根域土壤微生态的影响和对作物的防病促生作用已有很多报道[5-8]。但在实验室有明显抑菌作用的生防菌在盆栽和田间施用时，受生防制剂本身、病原物、寄主植物和环境因子(如土壤中营养源、温度、盐浓度、渗透性及 pH 等)影响较大，进而导致其在土壤中的定殖能力和防病效果不稳定[9]。而利用添加无机或有机物料作为生防菌的营养和固定载体，将帮助生防菌有效地在土壤中定殖，使其形成优势种群，协助生防菌达到更好的防治效果[10-11]。当前使用较多的微生物载体有草炭、蛭石、硅藻土、海藻酸钠等无机物料及菌糠、粪便等各种有机废弃物等[12-15]，但也存在负面影响[11,16]。

生物炭(biochar)是生物质在限氧条件下低温裂解产生的稳定富炭固体，可用秸秆及木屑等农林废弃物生产[17-18]，具有发达的孔隙度、巨大的比表面积和较强的吸附养分的能力，为土壤微生物提供栖息地，能改善土壤微生物群落结构，促进微生物多样性，提高土壤微生物活性[19-20]。生物炭作为优良的功能性微生物载体已受到国内外学者的关注。添加生物炭能增加土壤中菌根真菌[21]、固氮菌类群[22]及 *Enterobacter cloacae*[23]、*Bacillus mucilaginosus*[24-26]等有益微生物的数量。但 Aeron 等[27]比较土壤、木炭、木屑和木屑土，发现木屑土是 *Pseudomonas fluorescens* PS1 最有效的载体。因此需要对生物炭作为微生物载体的功能进行深入研究。

研究表明生物炭可通过调控土壤微生态环境，缓解连作障碍，对部分植物及土传病害有一定的防控作用[28-30]，但也存在一些争议[31]。因此利用生防菌剂配施生物炭来缓解防控连作障碍和土传病害已成为科研工作者研究的新方向[32]。那么生防菌配施棉秆炭对连作棉田土壤微生态影响如何？此方面的研究目前少见报道。因此，研究配施棉秆炭对土壤中生防放线菌数量的影响，及生防放线菌配施棉秆炭对连作棉田土壤微生态的影响具有重要意义。鉴于大田条件复杂多变，难以精确控制，本试验采用模拟法研究在施用一定生防放线菌的基础上，添加不同量的棉秆炭所引起的棉田连作土壤中生防放线菌和微生物区系的变化，以探索生防菌配施棉秆炭对增加生防放线菌数量、提高其防病促生效果的可行性及技术措施，为生防放线菌配施棉秆炭防治棉花土传病害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

棉秆炭由新疆农业科学院土壤肥料与农业节水研究所提供。棉花秸秆在 500 ℃厌氧条件处理 3 h 备用，粉碎后过 0.5 mm 筛。棉秆炭粒径(D)组成中，0.25 mm<D<0.5mm 占 52%，D<0.25 mm 占 48%。其基本理化性质为有机碳 771.80 g·kg^{-1}，全氮 15.72 g·kg^{-1}，全磷 15.31 g·kg^{-1}，全钾 25.04 g·kg^{-1}，pH 10.27，电导率 4.38 mS·cm^{-1}。

供试土壤采自河北省景县连作 6 年棉田。选取 6 个采样点，采集棉花根区土 0~20 cm 耕层土壤，风干后混匀，研磨过 0.5 cm 筛备用。

供试生防放线菌为编号 25#的黄三素链霉菌(*Streptomyces flavotricini*)为西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室分离筛选，对棉花黄萎病病原菌有较好抗性[33]。试验所用粉状活菌制剂采用固态发酵、低温烘干制备，活菌数为 5.3×10^{9} cfu·g^{-1}。

1.2 方法

1.2.1 土壤接种模拟试验

试验设 0 g·kg^{-1}(CK)、25.0 g·kg^{-1}、50.0 g·kg^{-1}、100.0 g·kg^{-1} 4 个棉秆炭用量处理，所有处理均接入 25#生防菌剂，接入量为 5.3×10^{6} cfu·g^{-1}(干土)。

定量称取 100 g 土样，按比例加入棉秆炭后置于 300 mL 广口瓶中，搅拌均匀后直接加入 25#生防菌剂混匀。每个处理 3 次重复。每瓶加 26 mL 无菌水，封口 28 ℃培养，培养期间采用等重加水法使每瓶质量相同，培养 15 d 后将瓶内土壤充分混匀，每瓶称取 10.0 g 进行土壤微生物数量测定及种类分析。

1.2.2 土壤微生物分离计数

不同处理土样均采用稀释平板涂抹法分离计数。细菌、真菌及放线菌所用培养基分别为牛肉膏蛋白胨培养基(BPA)、高氏 1 号培养基(GA)和马铃薯蔗糖培养基(PDA)[33]。为防止细菌生长，GA 培养基中灭菌前加入 1 g·L^{-1} 重铬酸钾至 80 μg·mL^{-1}，PDA 培养基中加入灭菌乳酸至终浓度为 3 mL·L^{-1}。细菌、放线菌及真菌分别于培养 2~3 d、5~7 d 及 3~5 d 后计数；再对单菌落的形态特征进行观察分析，将皿内形态特征完全相同菌落定为同一分类单元，并将数量多、比例高(占总数的 5%左右)的微生物定为优势菌。在对每种优势菌计数后挑取单菌落进行纯化、保藏、鉴定。

1.2.3 细菌菌种鉴定

对挑取的细菌，根据形态特征结合16S rDNA序列分析进行鉴定。采用酶解法提取细菌总DNA[34]。引物采用正向引物PA：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′；反向引物PB：5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′。扩增条件：94 ℃预变性4 min；94 ℃变性1 min，56 ℃退火1 min；72 ℃延长2 min，变性到延长30个循环；72 ℃延长10 min，4 ℃保存。扩增产物胶纯化后送南京金斯瑞生物技术有限公司进行测序。将获得序列与GenBank数据库中序列进行比对。

1.3 结果计算及数据统计分析

试验数据中，棉秆炭效应(ΔCK%)表示添加棉秆炭土壤中不同菌群的增幅；P_B(%)表示土壤中优势细菌占分离细菌总数的比例，P_A(%)表示土壤中小单孢菌、链霉菌、生防菌占分离放线菌总数的比例，P_F(%)表示土壤中优势真菌占分离真菌总数的比例，C_B(%)表示添加棉秆炭土壤中优势细菌的增幅。所有试验数据均利用 SAS 统计软件进行方差分析，并采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 生防菌剂配施棉秆炭对连作棉田土壤中微生物数量和比例的影响

由表 1 可知，生防菌剂配施棉秆炭使连作棉田土壤中细菌、真菌和放线菌数量显著增加。与单施菌剂处理(CK)相比，25.0 g·kg^{-1} 和 100.0 g·kg^{-1} 棉秆炭配施处理土壤中细菌数量显著增加 7 103.8%和 8 640.7%(P<0.05)。真菌和放线菌数量随棉秆炭添加量的增加比例逐渐增大。25.0 g·kg^{-1}、50.0 g·kg^{-1} 和 100.0 g·kg^{-1} 配施处理中真菌与放线菌数量分别显著增加 34.2%与 75.5%、469.6%与 165.1%和 2 289.4% 366.3%(P<0.05)。

表 1　生防菌配施不同量棉秆炭对连作棉田土壤中微生物数量的影响
Table 1　Populations of soil microorganisms in different treatments of biochar under application of antagonistic actinomycetes

棉秆炭 Biochar ($g\cdot kg^{-1}$)	细菌 Bacteria		真菌 Fungi		放线菌 Actinomycetes	
	数量 Population (10^7 $cfu\cdot g^{-1}$)	ΔCK%	数量 Population (10^3 $cfu\cdot g^{-1}$)	ΔCK%	数量 Population (10^6 $cfu\cdot g^{-1}$)	ΔCK%
0(CK)	4.50±1.39b	—	7.08±2.53c	—	2.61±0.18d	—
25	324.17±52.70a	7 103.8	9.50±1.77c	34.2	4.58±1.15c	75.5
50	17.42±6.75b	287.1	40.33±9.88b	469.6	6.92±0.50b	165.1
100	393.33±88.37a	8 640.7	169.17±22.68a	2 289.4	12.17±1.56a	366.3

表中同列数据后不同小写字母表示不同处理差异达显著水平($P<0.05$), ΔCK%表示添加棉秆炭土壤相对于 CK 的细菌、真菌和放线菌数量的增幅(%)。Values with different lowercase in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$. ΔCK% indicates the increase percentages of populations of bacteria, fungi and actinomycetes due to adding cotton stalk biochar.

从表 2 看出, 生防菌剂配施棉秆炭连作棉田土壤中微生物组成有较大变化。与单施放线菌菌剂相比, 25.0 $g\cdot kg^{-1}$ 配施棉秆炭处理使土壤中细菌/真菌数量比(B/F)、放线菌/真菌数量比(A/F)和细菌/放线菌数量比(B/A)分别增加了 5271.2%、30.8%和 3996.0%, 50.0 $g\cdot kg^{-1}$ 配施棉秆炭处理使土壤中 B/F 和 A/F 分别减少了 32.0%和 53.4%, 而 B/A 增加了 45.7%。100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 配施棉秆炭处理使土壤中的 B/F 和 B/A 分别增加了 266.0%和 1 768.8%, 而 A/F 减少了 80.5%。

2.2　生防菌剂配施棉秆炭对连作棉田土壤细菌类群分布的影响

从土壤中分离出的细菌种类和数量上来看, 主要以芽孢杆菌居多, 对其中 5 株数量较多的芽孢杆菌进行分子鉴定(表 3)。

表 2　生防菌配施不同量棉秆炭对连作棉田土壤中 3 大微生物类群比例的影响
Table 2　Ratios of three major microorganism groups of soil in different treatments of biochar under application of antagonistic actinomycetes

棉秆炭 Biochar ($g\cdot kg^{-1}$)	细菌/真菌 Bacteria/fungi		放线菌/真菌 Actionmycetes/fungi (A/F)		细菌/放线菌(B/A) Bacteria/actionmycetes	
	比值 Ratio	ΔCK%	比值 Ratio	ΔCK%	比值 Ratio	ΔCK%
0(CK)	6 352.9	—	368.2	—	17.3	—
25	341 228.1	5 271.2	481.6	30.8	708.6	3 996.0
50	4 318.2	−32.0	171.5	−53.4	25.2	45.7
100	23 251.2	266.0	71.9	−80.5	323.3	1 768.8

ΔCK%表示与 CK 相比, 添加棉秆炭土壤中 3 大微生物类群比例增幅(%)。ΔCK% indicates the increase percentages of ratios of the three major microorganism groups due to adding cotton stalk biochar.

表 3　连作棉田土壤中优势细菌菌落形态特征及分子鉴定
Table 3　Predominant bacteria in soil of continuous cropped cotton

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	最相近菌株 Closest known relative	相似度 Sequence identity (%)
YB1	乳白、不透明、圆形、奶状、湿润 Milky, opaque, round, milky, moist	*Bacillus thaonhiensis*	99.85
YB3	黄白、不透明、圆形、蜡状、半湿润 Yellow and white, opaque, round, waxy, semi-moist	*Bacillus bingmayongensis*	99.78
YB5	浅黄、透明、圆形、蜡状、半湿润 Pale yellow, transparent, round, waxy, semi-moist	*Bacillus oceanisediminis*	99.56
YB6	浅黄、不透明、圆形、油状、湿润 Pale yellow, opaque, round, oily, moist	*Bacillus asahii*	99.49
YB7	浅黄、不透明、圆形、油状、湿润 Pale yellow, opaque, round, oily, moist	*Bacillus cereus*	99.93

由表 4 可知, 连作棉田土壤在添加生防菌剂后配施不同量棉秆炭改变了土壤中优势细菌的种类、数量及比例。单施生防菌剂土壤中 YB1 和 YB3 细菌分别占分离细菌总数的 3.8%和 3.8%。而添加棉秆炭使这 2 种优势细菌数量增加, 其中 25.0 $g\cdot kg^{-1}$ 和 100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭处理使土壤中 YB1 和 YB3 数量分别较对照增加 170.6 倍、150.9 倍和 18.6 倍、3.9 倍, 均达到显著水平($P<0.05$); 但 50.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭处理 YB1 菌株数量增幅不大, YB3 菌株数量甚至减少。YB5、YB6 和 YB7 菌株在对照土壤中未检出, 而 25.0 $g\cdot kg^{-1}$、50.0 $g\cdot kg^{-1}$ 和 100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭处理中 YB5 菌株数量分别占分离细菌总数的 5.1%、5.7%和 7.4%; YB6 菌株数量分别占分离细菌总数的 6.7%、11.0%和 3.2%; YB7 菌株数量分别占分离细菌总数的 4.1%、7.2%和 2.8%。

表 4 生防菌配施不同量棉秆炭连作棉田土壤中优势细菌数量及比例

Table 4 Predominant bacteria population and proportion of soil in different treatments of biochar under application of antagonistic actinomycetes

菌株 Strain	棉秆炭 Biochar ($g\cdot kg^{-1}$)	数量 Population (10^7 $cfu\cdot g^{-1}$)	P_B (%)	菌株 Strain	棉秆炭 Biochar ($g\cdot kg^{-1}$)	数量 Population (10^7 $cfu\cdot g^{-1}$)	C_B (%)	P_B (%)
YB3 (*Bacillus oceanisediminis*)	0(CK)	0.00±0.00c	0.0	YB1 (*Bacillus thaonhiensis*)	0(CK)	0.17±0.29b	—	3.8
	25	16.67±7.64b	5.1		25	29.17±8.78a	170.6	9.0
	50	1.00±0.00c	5.7		50	1.42±0.29b	7.4	8.2
	100	29.17±5.20a	7.4		100	25.83±3.82a	150.9	6.6
YB4 (*Bacillus asahii*)	0(CK)	0.00±0.00c	0.0	YB2 (*Bacillus bingmayongensis*)	0(CK)	0.17±0.29a	—	3.8
	25	21.67±11.55a	6.7		25	3.33±3.82a	18.6	1.0
	50	1.92±0.14bc	11.0		50	0.00±0.00a	−1.0	0.0
	100	12.50±0.00ab	3.2		100	0.83±1.44a	3.9	0.2
YB5 (*Bacillus cereus*)	0(CK)	0.00±0.00b	0.0					
	25	13.33±1.44a	4.1					
	50	1.25±0.00b	7.2					
	100	10.83±5.20a	2.8					

表中同一株菌的同列数据后不同小写字母表示不同处理之间及处理与对照之间的差异达到显著水平($P<0.05$), P_B 表示土壤中优势细菌占分离细菌总数的比例, C_B 表示添加棉秆炭土壤中优势细菌增加的倍数。Values with different lowercases in the same column of the same strain indicate significant differences $P < 0.05$. P_B indicates proportion of dominant bacteria to total bacteria in soil. C_B indicates the increase rate of dominant bacteria due to adding cotton stalk biochar.

2.3 生防菌剂配施棉秆炭对连作棉田土壤放线菌类群分布的影响

由表 5 可以看出, 与单接生防菌剂相比, 所有棉秆炭配施处理均使土壤中小单孢菌和链霉菌数量分别增加 25.3%~85.8%和 44.4%~1 372.9%, 其中 100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭配施处理使小单孢菌、链霉菌数量分别较无炭对照显著增加 76.0%、1 372.9% ($P<0.05$)。

由表 5 看出, 棉秆生物炭对接入的生防菌数量影响显著。添加生物炭后, 土壤中生防放线菌黄三素链霉菌数量较无棉秆炭对照增加 49.8%~2 672.8%, 并使该菌在可培养放线菌总数中所占比例达到 49.4%。

表 5 生防菌配施不同量棉秆炭连作棉田土壤中小单孢菌、链霉菌和接入生防菌(黄三素链霉菌)数量及比例

Table 5 Populations and ratios of soil *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. and *Streptomyces flavotricini in* different treatments of biochar under application of antagonistic actinomycetes 10^5 $cfu\cdot g^{-1}$

棉秆炭 ($g\cdot kg^{-1}$) Biochar	小单孢菌 *Micromonospora* sp.			链霉菌 *Streptomyces* sp.			黄三素链霉菌(生防菌) *Streptomyces flavotricini* (antagonistic actinomycetes)		
	数量 Population (10^5 $cfu\cdot g^{-1}$)	ΔCK%	P_A (%)	数量 Population (10^5 $cfu\cdot g^{-1}$)	ΔCK%	P_A (%)	数量 Population (10^5 $cfu\cdot g^{-1}$)	ΔCK%	P_A (%)
0(CK)	5.92±0.76c	—	22.7	5.25±0.66b	—	20.1	2.17±0.38b	—	8.3
25	7.42±2.89bc	25.3	16.2	7.58±0.80b	44.4	16.6	3.25±0.50b	49.8	7.1
50	11.00±0.90a	85.8	15.9	12.08±3.22b	130.1	17.5	6.67±3.06b	207.4	9.6
100	10.42±0.88ab	76.0	8.6	77.33±22.85a	1 372.9	63.5	60.17±5.81a	2 672.8	49.4

ΔCK%表示添加棉秆炭土壤中小单孢菌、链霉菌、黄三素链霉菌的增幅(%), P_A 表示土壤中小单孢菌、链霉菌、黄三素链霉菌占分离放线菌总数比例。ΔCK% indicates the increase percentage of population of *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. and *Streptomyces flavotricini* due adding cotton stalk biochar. P_A indicates proportion of *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. and *Streptomyces flavotricini* to total actinomycetes in soil.

从比例来看, 棉秆炭配施处理使 3 种放线菌占分离放线菌总数的比例与数量呈现不同变化。与单施生防菌剂相比, 棉秆炭处理使小单孢菌占放线菌分离总数比例为 8.6%~16.2%, 始终低于对照, 且比例随棉秆炭用量的增加比例降低。25.0 $g\cdot kg^{-1}$ 和 50.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭配施处理使链霉菌占放线菌分离总数比例分别为 16.6%和 17.5%, 分别较对照降低了 17.4%和 12.9%; 而 100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭配施处理的比例为 63.5%, 较对照增加 215.9%。25.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭配施处理使 25#菌剂(黄三素链霉菌)占放线菌分离总数比例为 7.1%, 较对照降低; 而 100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭配施处理使这一比例为 49.4%, 显著高于对照。

2.4 生防菌剂配施棉秆炭对连作棉田土壤真菌类群分布的影响

从土壤中分离出的真菌种类和数量上来看，YF1、YF2 和 YF3 菌株检出数量大部分超过分离菌株总数的 5%，为连作棉田土壤中优势真菌菌群。经菌落和孢子形态特征初步鉴定这 3 株菌分别为米曲霉、黑曲霉和木霉。由表 6、表 7 可知，生防菌剂配施棉秆炭改变了连作棉田土壤中优势真菌的数量及比例。与单施生防菌剂相比，除 50.0 g·kg^{-1} 棉秆炭配施处理使 YF2 数量减少外，25.0 g·kg^{-1}、50.0 g·kg^{-1} 和 100.0 g·kg^{-1} 棉秆炭配施处理均使土壤中 3 种优势真菌数量增加，其中 100.0 g·kg^{-1} 棉秆炭配施处理分别显著增加 455.5%、244.8%和 8 936.1%(P<0.05)。但这 3 株优势真菌在分离真菌中所占的比例总体上随棉秆炭施入量的增加而减少，这有可能是棉秆炭增加了土壤中真菌总数所致。

表 6　连作棉田土壤中优势真菌菌落形态特征
Table 6　Predominant fungi in soil of continuous cropped cotton

优势真菌 Predominant fungi	菌落形态 Colony morphology	菌落颜色 Color	孢子 Spores	形态鉴定 Morphological identification
YF1	放射状，较疏松 Radial, looser	黄色 Yellow	黄色 Yellow	米曲霉 *Aspergillus oryzae*
YF2	放射、棉絮状，较密 Radial, denser	黑色 Black	黑色 Black	黑曲霉 *Aspergillus niger*
YF3	粉状，较密 Powdery, denser	白色 White	绿色 Green	木霉 *Trichoderma koningii*

表 7　生防菌配施不同量棉秆炭连作棉田土壤中优势真菌数量及比例
Table 7　Predominant fungi populations and percents of soil in different treatments of biochar under application of antagonistic actinomycetes

棉秆炭 Biochar (g·kg^{-1})	YF1 (*Aspergillus oryzae*)			YF2 (*Aspergillus niger*)			YF3 (*Trichoderma koningii*)		
	数量 Population (10^2 cfu·g^{-1})	ΔCK%	P_F (%)	数量 Population (10^2 cfu·g^{-1})	ΔCK%	P_F (%)	数量 Population (10^2 cfu·g^{-1})	ΔCK%	P_F (%)
0(CK)	15.00±5.00b	—	21.2	24.17±5.77b	—	34.1	0.83±1.44b	—	1.2
25	23.75±8.84b	58.3	25.0	25.00±10.61b	3.4	26.3	5.00±7.07b	502.4	5.3
50	21.67±14.22b	44.5	5.4	21.67±14.22b	−10.3	5.4	1.67±2.89b	101.2	0.4
100	83.33±14.43a	455.5	4.9	83.33±14.43a	244.8	4.9	75.00±0.00a	8 936.1	4.4

ΔCK%表示添加棉秆炭土壤中米曲霉、黑曲霉和木霉数量的增幅(%)，P_F 表示土壤中优势真菌占分离真菌总数的比例。ΔCK% indicates the increase percentage of population of *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma koningii* due to adding cotton stalk biochar. P_F indicates proportion of dominant fungi to total fungi in soil.

3 讨论

生防放线菌由于耐受性差、生长缓慢等特点并不利于发展活体制剂，且制备中存在不易繁殖，产孢量低，或多代繁殖后防治效果下降等问题。其生防活性在防治过程中也容易受到环境和营养因素的影响，存在稳定性和持效性较差等问题[35]。因此选择合适的营养物质、载体或与其他肥料配施从而发挥最大的生防活性将成为生防放线菌应用的关键问题。

目前常用泥炭、蛭石等无机矿物质作为生防菌的载体，但这些物质存在储量有限、分布不均及开采过程容易引起环境问题[11]。有机营养载体也存在有害生物的影响、重金属和盐分的积累、抗生素的残留等负面作用[16]。生物炭为秸秆、稻壳、竹木和动物粪便等有机废弃物料在限氧或绝氧条件下，通过 300~700 ℃高温裂解而来[18]，由于生产原料来源广泛，近些年来作为一种新型生防菌载体材料而被人们所关注。虽然生物炭结构中的苯环有很高的稳定性，但其中脂肪族和氧化态碳物质易于腐解，且本身含有大量 N、P、K、Ca、Mg 等可利用养分，可能被微生物分解利用[36-37]；但也有研究表明作为碳源或基质，生防真菌木霉菌对生物炭的利用效果没有葡萄糖、乳糖和淀粉的效果好[38]；有些生物炭甚至还可能对微生物繁殖具有潜在抑制作用[39]。此外由于生物炭具有多孔性，能够为微生物生存提供附着位点和较大空间，可作为植物益生菌或其他微生物的良好载体[25,40-41]；其较强的吸附性，可以吸附土壤中的养分，给生防菌提供良好的生存环境[42-43]。本研究表明生防放线菌与棉秆炭配施能改善连作棉田土壤微生物群落结构，增加生防放线菌黄三素链霉菌的数量。因此棉秆炭可以作为生防放线菌良好的载体，具有较大的生防潜力。但生物炭的种类、不同条件制备的生物炭及生物炭的添加量等因素均影响生物炭作为微生物载体的应用效果[25,42,44]。与单施生防放线菌的对照相比，施入棉秆炭使土壤中生

防放线菌黄三素链霉菌的数量增加。由于施入棉秆炭使土壤 pH 增高，而生防放线菌数量随棉秆炭施入量增加而增加，推测原因可能由于生防放线菌在偏碱性环境下也能生长良好，故能明显提高棉秆炭高施用量条件下生防菌的数量。

同时生物炭的输入也改变了单接生防菌剂土壤中微生物菌群的变化，生物炭的施用量对土壤中细菌、放线菌和真菌数量有显著的影响。武爱莲等[45]研究表明在 5~60 $g\cdot kg^{-1}$ 玉米秸秆生物炭范围内，能显著增加土壤中细菌的数量，增幅随其用量的增加而增加；但顾美英等[46]的研究表明土壤中细菌、放线菌和真菌数量随生物炭施入量的增加呈先增加后减少的趋势。本研究表明，与单施生防菌的对照相比，配施棉秆炭也显著提高了连作棉田土壤中细菌、放线菌和真菌数量，且有随棉秆炭加入量增加呈增加-降低-增加的趋势。100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 施入量微生物数量增幅明显，可能是土壤中生防放线菌数量的显著增加，抑制了土传病原菌的数量，土壤环境得到改善，微生物数量也随之增加，但这个高施用量对棉花的生长是否有影响，还需进行棉花种植试验验证。生防菌剂配施棉秆炭处理使土壤中细菌和放线菌数量较真菌数量相对增加，细菌/真菌数量比(B/F)和放线菌/真菌数量比(A/F)随棉秆炭施入量的增加而降低，对微生物群落结构有明显的调节作用，使连作棉田土壤向细菌性土壤转变，但这种变化是否是由生防菌数量增高引起，还是生物炭的作用，还需设置不施生防菌和不施棉秆炭的对照来进一步说明。

此外生防菌剂配施棉秆炭对不同的微生物种类也有不同的影响。本研究连作棉田土壤经生防菌剂配施棉秆炭共分离得到 5 株优势细菌，均为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。其中 *B. oceanisediminis* 菌数量随棉秆炭施入量增加而增加，*B. bingmayongensis* 菌数量则减少，其余 3 株则呈现先增加后减少的趋势。芽孢杆菌是植物病害生防微生物的重要组成部分，具有显著的生防潜力，它可以防治多种植物病害[47-49]。而蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)在 3 种浓度梯度棉秆炭处理的土壤中均有分离得到，而在对照土壤中未检出。有学者指出蜡样芽孢杆菌对作物有防病、促生及杀菌作用[50-51]。随棉秆炭施入量增加，放线菌中小单孢菌数量及比例降低，但链霉菌及接入生防菌剂的数量及比例增加。真菌中益生木霉数量也有所增加。由此推断在施用生防菌剂的基础上配施一定比例棉秆炭可促进土壤中有益细菌、放线菌和真菌的数量与比例。这些是否对缓解棉花连作障碍有积极影响，要对病原菌数量和优势微生物做深入分析。由于本研究为土壤培养试验，缺少作物根系的影响，还需进行田间试验验证。

4 结论

生防放线菌配施棉秆炭对连作棉田土壤中微生物区系有显著影响。与单施生防放线菌菌剂的处理相比，土壤中生防放线菌数量随着棉秆炭施用量增加而显著增加，棉秆炭具有作为生防放线菌良好载体的潜力。同时生防放线菌配施棉秆炭也显著提高了连作棉田土壤中微生物的数量且改变了优势微生物数量和比例，尤其提高了细菌中芽孢杆菌的数量和所占的比例；100.0 $g\cdot kg^{-1}$ 棉秆炭与菌剂配施使土壤中链霉菌的数量及比例显著高于对照，但使小单孢菌的数量降低。由此可以看出，生防放线菌配施棉秆炭能提高连作棉田土壤中生防放线菌的数量，增强生防菌制剂的防病促生作用，改善连作棉田土壤微生物群落结构，在防控棉花连作障碍上具有较大的应用潜力。

参考文献 References

[1] 阮维斌，王敬国，张福锁，等. 根际微生态系统理论在连作障碍中的应用[J]. 中国农业科技导报, 1999, 1(4): 53–58
Ruan W B, Wang J G, Zhang F S, et al. The application of rhizosphere micro-ecosystem theory to continuous cropping problem[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 1999, 1(4): 53–58

[2] 张俊英，许永利. 两株生防菌对连作土壤中黄瓜生长及微生物的影响[J]. 北方园艺, 2015(15): 28–31
Zhang J Y, Xu Y L. Effect of bio-control bacteria and fungus on cucumber growth and soil microbial population in continuous cropping soil[J]. Northern Horticulture, 2015(15): 28–31

[3] 曾衡，徐迪红，冀志霞，等. 烟草黑胫病生防菌的筛选、定殖及应用评价[J]. 应用与环境生物学报，2015，21(4): 672–677
Zeng H, Xu D H, Ji Z X, et al. Screening, colonization and application evaluation of biocontrol bacteria against tobacco black shank disease[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(4): 672–677

[4] 江木兰，赵瑞，胡小加，等. 油菜内生生防菌 BY-2 在油菜体内的定殖与对油菜菌核病的防治作用[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 192–196
Jiang M L, Zhao R, Hu X J, et al. Colonization of antifungal endobacterium BY-2 in oilcrop rape and its control effect on disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(2): 192–196

[5] 周永强，薛泉宏，杨斌，等. 生防放线菌对西瓜根域微生态的调整效应[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版，

2008, 36(4): 143–150
Zhou Y Q, Xue Q H, Yang B, et al. Adjusted effect of inoculating with biocontrol actinomyces on microbial flora of watermelon rooting zone[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(4): 143–150

[6] 申光辉，薛泉宏，张晶，等. 草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 中国农业科学，2012，45(22): 4612–4626
Shen G H, Xue Q H, Zhang J, et al. Screening, identification and biocontrol potential of antagonistic fungi against strawberry root rot and plant growth promotion[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(22): 4612–4626

[7] 薛磊，王建涛，刘相春，等. 拮抗性链霉菌对大丽轮枝菌微菌核形成与萌发的影响[J]. 植物保护学报，2012，39(4): 289–296
Xue L, Wang J T, Liu X C, et al. Inhibition of antagonistic *Streptomyces* spp. on microsclerotia formation and germination of *Verticillium dahliae*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2012, 39(4): 289–296

[8] 涂璇，薛泉宏，张宁燕，等. 辣椒疫病生防放线菌筛选及其对辣椒根系微生物区系的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(6): 141–146
Tu X, Xue Q H, Zhang N Y, et al. Screening bio-control actinomycetes to control pepper phytophthora blight and the impact of microbial population of pepper's rhizosphere[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(6): 141–146

[9] 张炳欣，张平，陈晓斌. 影响引入微生物根部定殖的因素[J]. 应用生态学报, 2000, 11(6): 951–953
Zhang B X, Zhang P, Chen X B. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2000, 11(6): 951–953

[10] 李慧，王平，肖明. 硅藻土和滑石粉作为荧光假单胞菌 P13 菌剂的载体研究[J]. 中国生物防治, 2009, 25(3): 239–244
Li H, Wang P, Xiao M. Use of diatomite and talc as carriers of the *Pseudomonas fluorescens* P13[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2009, 25(3): 239–244

[11] 李敏清，袁英英，区伟佳，等. 畜禽粪便堆肥作为功能微生物载体的研究[J]. 农业环境科学学报，2011，30(5): 1007–1013
Li M Q, Yuan Y Y, Qu W J, et al. Using animal manure as carrier of functional microorganism[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2011, 30(5): 1007–1013

[12] Kumar V, Sarma M V R K, Saharan K, et al. Effect of formulated root endophytic fungus Piriformospora indica and plant growth promoting rhizobacteria fluorescent pseudomonads R62 and R81 on Vigna mungo[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(2): 595–603

[13] 李永兴，匡柏健，李久蒂. 不同载体对微生物菌剂质量的影响[J]. 土壤肥料, 1999(6): 30–32
Li Y X, Kuang B J, Li J D. Effect of different carriers on microbial quality[J]. Soil Fertilizer, 1999(6): 30–32

[14] 刘雯雯，姚拓，孙丽娜，等. 菌糠作为微生物肥料载体的研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 787–791
Liu W W, Yao T, Sun L N, et al. The feasibility of spent mushroom substrate as a kind of microbial fertilizer carrier[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(2): 787–791

[15] 刘方春，邢尚军，马海林，等. 不同有机废弃物作为假单胞菌 YT3 吸附载体的研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(6): 1194–1200
Liu F C, Xing S J, Ma H L, et al. Different organic wastes as carriers for *Pseudomonas* YT3[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(6): 1194–1200

[16] 李兴龙，李彦忠. 土传病害生物防治研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24(3): 204–212
Li X L, Li Y Z. Research advances in biological control of soil-borne disease[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(3): 204–212

[17] Lehmann J. A handful of carbon[J]. Nature, 2007, 447(7141): 143–144

[18] 陈温福，张伟明，孟军. 农用生物炭研究进展与前景[J]. 中国农业科学, 2013, 46(16): 3324–3333
Chen W F, Zhang W M, Meng J. Advances and prospects in research of biochar utilization in agriculture[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(16): 3324–3333

[19] 奚振邦，王寓群，杨佩珍. 中国现代农业发展中的有机肥问题[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 1874–1878
Xi Z B, Wang Y Q, Yang P Z. The issue on organic manure in developing modern agriculture in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(12): 1874–1878

[20] 顾美英，葛春辉，马海刚，等. 生物炭对新疆沙土微生物区系及土壤酶活性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2016, 34(4): 225–230
Gu M Y, Ge C H, Ma H G, et al. Effects of biochar application amount on microbial flora and soil enzyme activities in sandy soil of Xinjiang[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2016, 34(4): 225–230

[21] 饶霜，卢阳，黄飞，等. 生物炭对土壤微生物的影响研究进展[J]. 生态与农村环境学报, 2016, 32(1): 53–59
Rao S, Lu Y, Huang F, et al. A review of researches on effects of biochars on soil microorganisms[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2016, 32(1): 53–59

[22] Jaafar N M. Biochar as a habitat for arbuscular mycorrhizal fungi[M]//Solaiman Z M, Abbott L K, Varma A. Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration: Soil Biology. Berlin Heidelberg: Springer, 2014, 41: 297–311

[23] 宋延静，张晓黎，龚骏. 添加生物质炭对滨海盐碱土固氮菌丰度及群落结构的影响[J]. 生态学杂志，2014，33(8): 2168–2175
Song Y J, Zhang X L, Gong J. Effects of biochar amendment on the abundance and community structure of nitrogen-fixing microbes in a coastal alkaline soil[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(8): 2168–2175

[24] Hale L, Luth M, Kenney R, et al. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 84: 192–199

[25] Sun D Q, Meng J, Liang H, et al. Effect of volatile organic compounds absorbed to fresh biochar on survival of *Bacillus mucilaginosus* and structure of soil microbial communities[J].

Journal of Soils and Sediments, 2015, 15(2): 271–281
[26] Sun D Q, Hale L, Crowley D. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier[J]. Biology and Fertility of Soils, 2016, 52(4): 515–522
[27] Aeron A, Dubey R C, Maheshwari D K, et al. Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PS1 and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.)[J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 131(1): 81–93
[28] 邹春娇, 张勇勇, 张一鸣, 等. 生物炭对设施连作黄瓜根域基质酶活性和微生物的调节[J]. 应用生态学报, 2015, 26(6): 1772–1778
Zou C J, Zhang Y Y, Zhang Y M, et al. Regulation of biochar on matrix enzyme activities and microorganisms around cucumber roots under continuous cropping[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(6): 1772–1778
[29] Singla A, Iwasa H, Inubushi K. Effect of biogas digested slurry based-biochar and digested liquid on N_2O, CO_2 flux and crop yield for three continuous cropping cycles of komatsuna (*Brassica rapa* var. perviridis)[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(8): 1201–1209
[30] Lehmann J, Rillig M C, Thies J, et al. Biochar effects on soil biota-a review[J]. Soil Biology Biochemistry, 2011, 43(9): 1812–1836
[31] 马艳, 王光飞. 生物炭防控植物土传病害研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2014(6): 14–20
Ma Y, Wang G F. Review of biochar utilization on soil-borne disease control[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2014(6): 14–20
[32] 陈伟, 周波, 束怀瑞. 生物炭和有机肥处理对平邑甜茶根系和土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(18): 3850–3856
Chen W, Zhou B, Shu H R. Effects of organic fertilizer and biochar on root system and microbial functional diversity of *Malus hupehensis* Rehd[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(18): 3850–3856
[33] 魏晓丽, 陈杰, 何斐, 等. 拮抗链霉菌对棉花幼苗光合和生长的影响及其在棉花根内的定殖[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(9): 78–84
Wei X L, Chen J, He F, et al. Colonization and effects of antagonistic *streptomyces* on leaf photosynthetic characteristics and growth of cotton seedlings[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2013, 41(9): 78–84
[34] 程丽娟, 薛泉宏, 韦革宏, 等. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 80–83
Cheng L J, Xue Q H, Wei G H, et al. Experimental Techniques of Microbiology[M]. Xi'an: World Press Company, 2000: 80–83
[35] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 40–45
Xu L H, Li W J, Liu Z H, et al. Actinomycete Systematic — Principle, Methods and Practice[M]. Beijing: Science Press, 2007: 40–45
[36] Schmidt M W I, Noack A G. Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2000, 14(3): 777–793
[37] Farrell M, Kuhn T K, Macdonald L M, et al. Microbial utilisation of biochar-derived carbon[J]. Science of the Total Environment, 2013, 465: 288–297
[38] 甄雅静, 谭磊, 姚远, 等. 不同碳源对生防木霉菌 T23、T56 生长和生防活性的影响[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(8): 11–15
Zhen Y J, Tan L, Yao Y, et al. Effects of different carbon sources on growth and biocontrol activity of *Trichoderma* T23 and T56[J]. China Plant Protection, 2016, 36(8): 11–15
[39] Gurtler J B, Boateng A A, Han Y H, et al. Inactivation of *E. coli* O157:H7 in cultivable soil by fast and slow pyrolysis-generated biochar[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(3): 215–223
[40] Warnock D D, Lehmann J, Kuyper T W, et al. Mycorrhizal responses to biochar in soil — concepts and mechanisms[J]. Plant and Soil, 2007, 300(1/2): 9–20
[41] 付盼, 周辉, 赵雨薇, 等. 三聚氰胺降解菌的分离鉴定及其生物炭固定化研究[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2015, 54(4): 498–504
Fu P, Zhou H, Zhao Y W, et al. Isolation and identification of melamine-degrading strain and its immobilization on biochar[J]. Journal of Fudan University: Natural Science, 2015, 54(4): 498–504
[42] 王潇敏, 李恋卿, 潘根兴, 等. 胶冻样芽孢杆菌与生物质炭复配及对番茄产量和品质的影响[J]. 土壤, 2016, 48(3): 479–485
Wang X M, Li L Q, Pan G X, et al. Compound of *Bacillus mucilaginosus* and biochar and its effects on tomato yield and quality[J]. Soils, 2016, 48(3): 479–485
[43] 赵军, 耿增超, 尚杰, 等. 生物炭及炭基硝酸铵对土壤微生物量碳、氮及酶活性的影响[J]. 生态学报, 2016, 36(8): 2355–2362
Zhao J, Geng Z C, Shang J, et al. Effects of biochar and biochar-based ammonium nitrate fertilizers on soil microbial biomass carbon and nitrogen and enzyme activities[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(8): 2355–2362
[44] 董金星, 杨梦娇, 陈小芳, 等. 生物炭作为 EM 菌载体影响因素及其条件优化[J]. 安徽科技学院学报, 2015, 29(6): 81–86
Dong J X, Yang M J, Chen X F, et al. The impact factors and the conditional optimization of biochar as the carrier of effective microorganisms[J]. Journal of Anhui Science and Technology University, 2015, 29(6): 81–86
[45] 武爱莲, 丁玉川, 焦晓燕, 等. 玉米秸秆生物炭对褐土微生物功能多样性及细菌群落的影响[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(6): 736–743
Wu A L, Ding Y C, Jiao X Y, et al. Effect of corn-stalk biochar on soil microbial functional diversity and bacterial community in cinnamon soils[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2016, 24(6): 736–743
[46] 顾美英, 葛春辉, 马海刚, 等. 生物炭对新疆沙土微生物区系及土壤酶活性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2016, 34(4): 225–230

Gu M Y, Ge C H, Ma H G, et al. Effects of biochar application amount on microbial flora and soil enzyme activities in sandy soil of Xinjiang[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2016, 34(4): 225–230

[47] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展[J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109–112
Cheng H B, Liu X Q, Chen H M. Research advance in controlling plant fungous diseases by *Bacillus subtilis*[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2006, 22(1): 109–112

[48] 崔云龙, 姬金红, 衣海青. 短小芽孢杆菌 D82 对小麦根腐病原菌拮抗的研究[J]. 中国生物防治, 1995, 11(3): 114–118
Cui Y L, Ji J H, Yi H Q. Antagonism of *Bacillus pumillus* D82 to *helminthosporium sativum*, a common root rot pathogen of wheat[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1995, 11(3): 114–118

[49] 黎起秦, 叶云峰, 王涛, 等. 内生枯草芽孢杆菌 B47 菌株入侵番茄的途径及其定殖部位[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 133–137
Li Q Q, Ye Y F, Wang T, et al. Entrance of endophytic *Bacillus subtilis* strain B47 into tomato plant and its colonization inside the plant[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(2): 133–137

[50] 唐容容, 杨文革, 胡永红, 等. 蜡样芽孢杆菌 CGMCC4348 菌株防治番茄灰霉病的效果及机理研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(8): 1817–1820
Tang R R, Yang W G, Hu Y H, et al. Control effect and mechanism of strain *Bacillus cereus* CGMCC4348 to *Botrytis cinerea*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2013, 52(8): 1817–1820

[51] 黄秋斌, 张颖, 刘凤英, 等. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果[J]. 生态学报, 2014, 34(10): 2559–2566
Huang Q B, Zhang Y, Liu F Y, et al. Colonization dynamics of *Bacillus cereus* B3-7 on wheat roots and control efficiency against sharp eyespot of wheat[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(10): 2559–2566